

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, соединение под лабораторным шифром РУ-1203 проявляло антиноцицептивные свойства при различных путях введения, в том числе и при приеме внутрь, что открывает перспективы создания на его основе эффективной пероральной лекарственной формы, в отличие от буторфанолола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брюзгин В. В. Лечение хронической боли у онкологических больных // *Consilium medicum*. — 2000. — Vol. 2, № 12. — P. 514—518.

2. Гречко О.Ю., Васильев П.М., Черников М.В. и др. // *Психофармакол. биол. наркол.* — 2007. — Т. 7. — С. 1666—1667.

3. Гречко О. Ю., Елисеева Н. В., Спасов А. А. и др. Поиск веществ с каппа-опиоидной активностью // *Человек и лекарство: тезисы докладов XVII Российского национального конгресса апреля 2010 г.* — М., 2010. — С. 599—600.

4. Collett B., Harald B., et al. // *European Journal of Pain*. — 2006. — Vol. 10, № 4. — P. 287—333.

5. Gillis J. C., et al. // *Drugs*. — 1995. — Vol. 50, № 1. — P. 157—175.

6. Kivell B., Prinszano T. E. // *Psychopharmacology (Berl)*. — 2010. — Vol. 210, № 2. — P. 109—119.

7. Le Bars D., Gozariu M., et al. // *Pharmacol. Rev.* — 2001. — Vol. 53, № 4. — P. 597—652.

8. Park H. S., Lee H. Y., Kim Y. H., et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2006. — Vol. 16. — № 13. — P. 3609—3613.

9. Rostaing-Rigattieri S., et al. // *Bull Cancer*. — 2003. — Vol. 90, № 8. — P. 795—806.

Н. А. Гурова, А. С. Питерсен, В. Ю. Федорчук, Д. В. Косолапова

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии

ВЛИЯНИЕ АМИЛОРИДА НА АКТИВНОСТЬ Na^+/H^+ -ОБМЕННИКА ТРОМБОЦИТОВ

УДК 615.761:616.1-092.9

Установлено, что амилорид дозозависимо ингибировал Na^+/H^+ -обменник и IC_{50} ингибирования составила $1,23 \times 10^{-6}$ М/л. Острая токсичность амилориды изучалась на мышах при внутрибрюшинном введении, и LD_{50} составила 35 мг/кг, а условный терапевтический индекс равнялся 106,1 условных единиц.

Ключевые слова: Na^+/H^+ -обменник, тромбоциты, амилорид, LD_{50} .

N. A. Gurova, A. S. Pitsersen, V. Y. Fedorchuk, D. V. Kosolapova

AMILORIDE EFFECT ON THE ACTIVITY OF PLATELET Na^+/H^+ -EXCHANGER

It was determined that amiloride inhibited platelet Na^+/H^+ -exchange in dose-dependent manner and IC_{50} was $1,23 \times 10^{-6}$ M/L. Acute toxicity of amiloride was investigated in mice after i. p. administration, and LD_{50} amounted to 35 mg/kg. Conditional therapeutic index of 106,1 units was calculated.

Key words: Na^+/H^+ -exchanger, platelets, amiloride, LD_{50} .

Интенсивная терапия ишемической болезни сердца остается актуальной задачей современной кардиологии [5, 6, 7, 8, 10]. Однако применение в последние годы активных терапевтических и хирургических методов лечения способствовало возникновению новой серьезной проблемы — развитию постишемического реперфузионного синдрома, который приводит к увеличению тяжести и зоны повреждения и, как следствие, нарушению сократимости, развитию аритмий, острой сердечной недостаточности [3, 5, 6, 11].

Основные принципы современной кардиопротекции направлены на сохранение коронарного кровотока, замедление ремоделирования камер сердца, повышение толерантности к повреждающему действию различных экзо- и эндогенных факторов [4, 6—8, 10, 11].

Среди выдвигаемых новых подходов перспективным выглядит использование соединений, способствующих развитию так называемого «ишемического preconditionирования» (ischemic preconditioning), своеобразной тренировки сердечной мышцы, повышающей ее адаптацию к ишемии и реперфузии [3]. Одной из таких групп являются ингибиторы Na^+/H^+ -обменника изоформы 1 (NHE-1). Эта изоформа локализуется преимущественно в плазматической мембране миокарда, тромбоцитах и эритроцитах [3, 12, 13, 15] и вовлечена в регулирование внутриклеточного pH во время ишемии/реперфузии. Однако чрезмерное стимулирование NHE-1 способствует увеличению содержания внутриклеточного Ca^{++} , что приводит к аритмиям и «оглушению» миокарда и дальнейшему некрозу [3, 12]. Кардиопротекция

текторное действие ингибиторов NHE-1 связано с уменьшением повреждающего действия чрезмерной активации данного обменника [3, 12, 13]. Одним из его первых известных ингибиторов является амилорид. В литературе встречаются неоднозначные данные об его активности в отношении NHE-1, а также его токсичности [3, 14]. Поэтому мы посчитали необходимым изучить NHE-1-ингибирующую активность препарата на тромбоцитах кролика, летальную дозу при внутрибрюшинном введении, а также рассчитать терапевтический индекс.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния амилорида на активность NHE-1 тромбоцитов кролика и острой токсичности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения влияния амилорида на активность Na⁺/H⁺-обменника была использована методика на тромбоцитах кролика, описанная Roskopf D., et al. (1991) и Kusumoto K. (2002) [2, 15, 13]. Образцы крови забирали из краевой вены уха кролика в пробирку, содержащую 3,8 % цитрата натрия, в соотношении 1 : 10. Каждый образец центрифугировали с числом 1000 об./мин в течение 12 мин. Собирали надосадочную часть — плазму, богатую тромбоцитами (ПБогТ). Активацию NHE-1 проводили раствором пропионата натрия (600 мкл, в ммоль/л: Na пропионат 135, HEPES 20, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, глюкоза 10; pH 6,7; t = 37 °C). Для контроля изменения светопропускания в условиях нормальной pH использовали раствор Кребса (600 мкл, в ммоль/л: NaCl — 120, KCl — 4,8, K₂PO₄ — 1,2, MgSO₄ — 2,5, NaHCO₃ — 25, CaCl₂ — 2,6, глюкоза — 5,4; pH 7,4; t = 37 °C).

Амилорид (10 мкл) добавляли в кювету с ПБогТ (200 мкл) и инкубировали 3—5 минут при температуре 37 °C, постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (1000 об. в мин). Исследования проводились в диапазоне концентраций 10⁻⁷—10⁻⁵ М/л.

Изменения формы тромбоцитов регистрировали по изменению светопропускания [13, 15] с помощью лазерного агрегометра «БИОЛА-220 ЛА», Россия.

Рассчитывали IC₅₀-концентрацию соединения, при которой NHE ингибирующая активность составляет 50 %. Величину IC₅₀ амилорида определяли с помощью регрессионного анализа зависимости между lg концентрации и активностью обменника Excel 2007 (MS Office XP, США).

Изучение острой токсичности амилорида проводили на 30 половозрелых мышях-самцах массой 20—30 мг/кг. Вещество вводили животным внутрибрюшинно в дозах 10, 20, 30, 40, 50 мг/кг.

Общая продолжительность наблюдения за животными составляла 14 дней. Первые сутки мыши находились под непрерывным наблюдением. У них отмечали общее состояние, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители и сроки гибели. Последующие 2 недели наблюдали за выживаемостью животных.

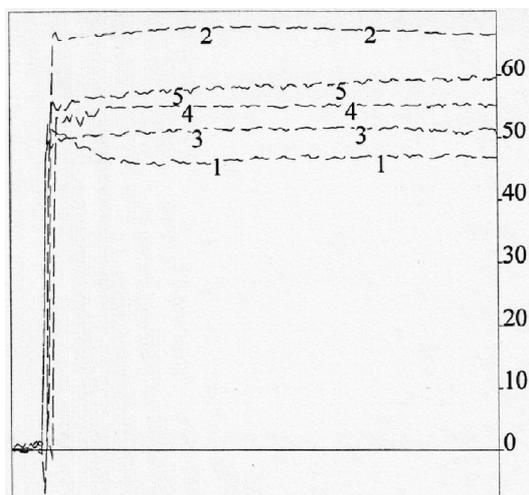
Расчет LD₅₀ (мг/кг) производили с использованием пробит-анализа [9], реализованного в программе Excel 2007 (MS Office XP, США).

Терапевтический индекс рассчитывали с использованием известной формулы с учетом IC₅₀ и LD₅₀ амилорида.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При добавлении раствора пропионата натрия к ПБогТ происходит увеличение притока натрия, связанное с выделением цитозольного H⁺, посредством Na⁺/H⁺-обменника, ведущее к отеку тромбоцитов в результате аккумуляции воды в цитоплазме [13, 15]. При этом наблюдается облегчение светопропускания.

В контрольной серии экспериментов при добавлении к ПБогТ натрийпропионатного буфера происходил значительный рост светопропускания по сравнению с добавлением раствора Кребса (рис. 1).



Обозначения: 1 — контроль с раствором Кребса; 2 — контроль с натрия пропионатным буфером; 3 — опыт с амилоридом в дозе 1 × 10⁻⁵ М/л; 4 — опыт с амилоридом в дозе 1 × 10⁻⁶ М/л; 5 — опыт с амилоридом в дозе 1 × 10⁻⁷ М/л.

Рис. 1. Кривые записи изменения светопропускания при введении в пробы различных доз амилорида (лазерный агрегометр «БИОЛА-220 ЛА», Россия)

В условиях предварительного добавления к ПБогТ амилорида изменение светопропускания было незначительным (рис. 1), что вероятно связано с блокадой NHE и отсутствием сферуляции тромбоцитов. Это согласуется с данными литературы [13, 15]. В ходе проведенного исследования было показано дозозависимое угнетение активности NHE-1 при использовании амилорида в диапазоне концентраций 10⁻⁷—10⁻⁵ М/л (рис. 1). Рассчитана величина IC₅₀, которая составила 1,23 × 10⁻⁶ М/л (рис. 2).

При изучении острой токсичности амилорида при внутрибрюшинном введении мышам было показано, что в течение первого часа после введения соединения во всех экспериментальных группах

изменений не отмечалось: сохранялась активная поисковая деятельность, тактильная и болевая чувствительность, отсутствовали судороги.

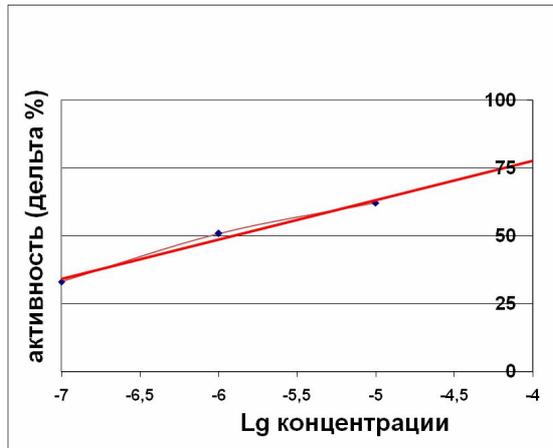


Рис. 2. Зависимость ингибирующего эффекта амилорида на Na^+/H^+ -обменник от концентрации (расчет величины IC_{50})

Однако в течение суток у некоторых животных наблюдалось увеличение частоты дыхания, угнетение двигательной активности и координации в движениях, снижение тонуса скелетных мышц, отсутствие реакций на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, появление судорог, смерть животных.

По результатам исследования гибель животных наблюдалась, начиная с дозы 20 мг/кг. С увеличением вводимой дозы амилорида количество погибших животных возрастало.

Для расчета LD_{50} процент гибели был переведен в пробит-баллы с помощью специальных таблиц [9], и рассчитан логарифм концентраций (рис. 3).

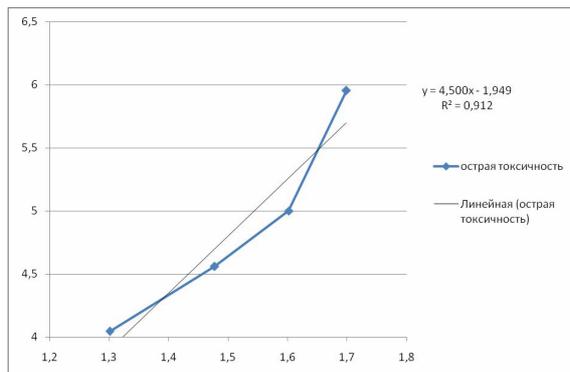


Рис. 3. Дозовая зависимость гибели в координатах «lg дозы-пробит» при изучении острой токсичности амилорида

Рассчитана величина LD_{50} для одних суток, которая для препарата амилорида при внутрибрюшинном введении составила 35 мг/кг. В период двухнедельного наблюдения дополнительной гибели животных не было. Учитывая классификацию токсичности химических веществ при парентеральном способе введения по Березовской [1], амилорид можно отнести к умеренно токсичным.

Был рассчитан терапевтический индекс, который составил 106,1 условных единиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Амилорид оказывает дозозависимое ингибирующее действие на активность NHE-1 тромбоцитов кролика. IC_{50} составила $1,23 \cdot 10^{-6}$ М/л. Полученные данные сопоставимы с литературными данными (база данных EMBL-EBI, 2010). Амилорид относится к умеренно токсичным соединениям, летальная доза составляет 35 мг/кг. Терапевтический индекс амилорида — 106,1 условных единиц.

ЛИТЕРАТУРА

- Березовская И. В. // Хим.-фармац. журн. — 2003. — № 3 (37). — С. 32—34.
- Гурова Н. А., Спасов А. А., Питерсен А. С. // Вестник ВолгГМУ. — 2011. — № 2 (38). — С. 70—72.
- Зверев Я. Ф., Брюханов В. М. // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2003. — № 3 (2). — С. 16—34.
- Иежица И. Н., Спасов А. А., Харитонова М. В. // Микроэлементы в медицине. — 2008. — № 1—2 (9). — С. 53—54.
- Мамедов М. Н., Канорский С. Г., Концевая А. В. // Кардиология. — 2011. — № 4. — С. 56—64.
- Михин В.П., Савельева В.В. // Российский кардиологический журнал. — 2009. — № 1 (75). — С. 49—56.
- Петров В. И., Бакумова П. А., Воронин С. П. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2006. — № 4. — С. 28—31.
- Петров В. И., Магницкая О. В., Лиходеева Ю. В., Малахов А. И. // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2011. — №2 (7). — С. 410—451.
- Платонов А. Г., Ахалая М. Я. Дозовая зависимость постлучевой гибели. Расчет полуплетальной дозы LD_{50} методом пробит-анализа. — М., 2006. — 33 с.
- Спасов А. А., Косолапов В. А., Островский О. В. и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003. — № 4 (66). — С. 17—20.
- Тюренок И. Н., Перфилова В. Н., Гречко О. Ю. // Вестник ВолгГМУ. — 2010. — № 1 (33). — С. 74—76.
- Filegel L. // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. — 2008. — № 44. — P. 228—237.
- Kusumoto K., Igata H., Abe A., et al. // British Journal of Pharmacology. — 2002. — № 135. — P. 1995—2003.
- Oliveira P., Sousa M., Barros A., Moura T. // Reproduction. — 2009. — № 137. — P. 354—355.
- Rosskopf D., Morgenstern E., Scholz W., et al. // Journal of Hypertension. — 1991. — № 9. — P. 231—238.